

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jelena Jakupić

**Molekularna istraživanja haplotipova
HLA-DRB1*03-DRB3 u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Kliničkoj jedinici za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb, pod vodstvom prof. dr. sc. Zorane Grubić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujem svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Zorani Grubić, koja mi je pružila priliku i omogućila svu potrebnu opremu za provedbu ovog diplomskog rada, i što je uvijek imala strpljenja i vremena za sva moja pitanja i nejasnoće. Posebno Vam hvala na savjetima, nesebičnoj pomoći te ukazanom povjerenju i razumijevanju koji su doveli do stvaranja jednog lijepog iskustva.

Od srca se zahvaljujem i svim ostalim djelatnicama i djelatnicima Kliničke jedinice za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb koji su uvelike pomogli u realizaciji ovog rada svojom susretljivošću, savjetima i ugodnim društvom, a posebice dr.sc. Mariji Burek Kamenarić i mag. biol. mol. Mariji Maskalan na pruženom strpljenju i pomoći te prenesenom znanju.

Također, zahvaljujem se svim svojim prijateljicama i prijateljima, koji su bez obzira na udaljenost, uvijek bili potpora, oslonac i ugodno društvo te su period mog studiranja učinili laganim, bezbrižnim i zabavnim.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i sestri, na ljubavi i bezuvjetnoj podršci, što su me usmjerili na pravi put i omogućili mi obrazovanje tijekom kojeg su mi bili najveća potpora i snaga. Vi ste zaslužni za sva moja postignuća. Hvala Vam!

I na kraju, ovaj rad posvećujem jedinom koji ne može biti tu, a bio je velika potpora bilo u teškim ili u radosnim trenucima tijekom svih godina studiranja, pružio mi najljepše trenutke i dao mi hrabrost da nemoguće pretvorim u moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularna istraživanja haplotipova HLA-DRB1*03-DRB3 u Hrvatskoj

Jelena Jakupić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U radu je istražena raznovrsnost haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01 i haplotipova HLA-DRB1*03:01-DRB3 u Hrvatskoj. Prva ispitivana skupina obuhvatila je 157 obitelji u kojima je jedan od roditelja bio pozitivan za alel HLA-DRB1*03:01 i unutar kojih smo segregacijom pratili nasljeđivanje haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01. Druga skupina obuhvaćala je 73 zdrava nesrodna ispitanika pozitivna za alel HLA-DRB1*03:01, koji su testirani za gen HLA-DRB3. Svim ispitanicima uključenim u istraživanje određeni su aleli lokusa HLA-A, -B i -DRB1 metodom lančane reakcije polimerazom i sondama specifičnim za alel/alele pojedinog lokusa HLA (PCR-SSO), dok su aleli lokusa HLA-DRB3 određeni metodom lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnim za alel/alele (PCR-SSP). Alel HLA-DRB1*03:01 pokazao je snažnu neravnotežu udruživanja s alelom HLA-B*08:01, a najčešći haplotip bio je HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 (47,8%). Uočena su dva alela na lokusu HLA-DRB3 (DRB3*01:01:02 i DRB3*02:02:01:01; 67,1% i 32,9%). Kod 92,7% ispitanika pozitivnih za alel HLA-B*08:01 bio je prisutan alel HLA-DRB3*01:01:02 ($p < 0,001$). Na kombinaciju HLA-DRB1*03:01-DRB3 utječe prisustvo/odsustvo alela HLA-B*08:01, dok aleli HLA-A nemaju utjecaj.

(49 stranica; 12 slika; 14 tablica, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: geni HLA, polimorfizam gena HLA-DRB3, haplotipovi HLA, genska neravnoteža udruživanja

Voditelj: Dr. sc. Zorana Grubić, izv. prof., KBC Zagreb

Suvoditelj: Dr. sc. Ana Galov, doc., PMF Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenitelji: Dr. sc. Renata Matonićkin Kepčija, izv. prof., PMF Sveučilišta u Zagrebu

Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof., PMF Sveučilišta u Zagrebu

Zamjena: Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc., PMF Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćen: 01.12.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Molecular analysis of HLA-DRB1*03-DRB3 haplotypes in the Croatia

Jelena Jakupić

Rooseveltovej trg, 10000 Zagreb, Hrvatska

In the present study the diversity of HLA-A-B-DRB1*03:01 and HLA-DRB1*03:01-DRB3 haplotypes in the Croatian population was analyzed. The first tested group included 157 families in which at least one parent was positive for HLA-DRB1*03:01 allele. HLA-A-B-DRB1*03:01 haplotypes were determined by segregation analysis. The second group included 73 unrelated healthy subjects positive for HLA-DRB1*03:01 allele, who were further analyzed for polymorphism of HLA-DRB3 gene. All subjects were tested for HLA-A, -B and -DRB1 alleles by Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Probes (PCR-SSO) method, while HLA-DRB3 alleles were identified by Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers (PCR-SSP) method. The HLA-DRB1*03:01 allele exhibited strong linkage disequilibrium with HLA-B*08:01 allele, while the most frequent haplotype was HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 (47.8%). Two alleles were detected at HLA-DRB3 locus (DRB3*01:01:02 and DRB3*02:02:01:01; 67.1% and 32.9%, respectively). A total of 92.7% HLA-B*08:01 positive subjects were also positive for HLA-DRB3*01:01:02 allele ($P < 0.01$). Combination of HLA-DRB1*03:01-DRB3 haplotype is associated with presence/absence of HLA-B*08:01 allele, while HLA-A alleles don't have any influence.

(49 pages, 12 figures, 14 tables, 30 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: HLA genes, polymorphism of HLA-DRB3 gene, HLA haplotypes, linkage disequilibrium

Supervisor: Dr. Zorana Grubić, Assoc. Prof., University Hospital Centre Zagreb

Co-supervisor: Dr. Ana Galov, Asst. Prof., University in Zagreb

Reviewers: Dr. Renata Matoničkin Kepčija, Assoc. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Replacement: Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 01.12.2016.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Glavni sustav tkivne snošljivosti	2
1.2. Genomska organizacija sustava.....	3
1.2.1. Građa gena HLA razreda I.....	4
1.2.2. Građa gena HLA razreda II	5
1.3. Antigen predočne molekule sustava HLA.....	7
1.3.1. Građa i uloga molekula HLA razreda I	7
1.3.2. Građa i uloga molekula HLA razreda II	8
1.4. Osobitosti sustava HLA	10
1.4.1. Krosingover - rekombinacija	10
1.4.2. Polimorfizam	11
1.4.3. Genska neravnoteža udruživanja	15
1.5. Organizacija podregije HLA-DR	16
1.6. Gen HLA-DRB1*03	17
1.6.1. Haplotipovi alela HLA-DRB1*03:01	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJAL I METODE.....	23
3.1. Materijal	24
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Izolacija DNA.....	24
3.2.2. Tipizacija gena HLA-A, -B i -DRB1.....	25
3.2.3. Tipizacija gena HLA-DRB3	25
3.2.4. Statistika i obrada podataka	27
4. REZULTATI.....	28
4.1. Raspodjela alela HLA-A, -B, -DRB1 i haplotipova koje tvore u skupini obitelji.....	29

4.2. Analiza haplotipova alela DRB1*03:01 unutar obitelji.....	30
4.2.1. Analiza haplotipova HLA-B-DRB1*03:01	30
4.2.2. Analiza haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01	31
4.3. Analiza alela HLA-DRB3 unutar druge skupine ispitanika	34
4.3.1. Analiza alela HLA-A kod podskupine ispitanika pozitivnih za kombinaciju alela HLA-B*08:01-DRB1*03:01.....	35
4.3.2. Analiza alela HLA-A, -B kod podskupine ispitanika negativnih za alel HLA- B*08:01	35
5. RASPRAVA.....	38
6. ZAKLJUČAK	42
7. LITERATURA.....	44
8. ŽIVOTOPIS	48

1. UVOD

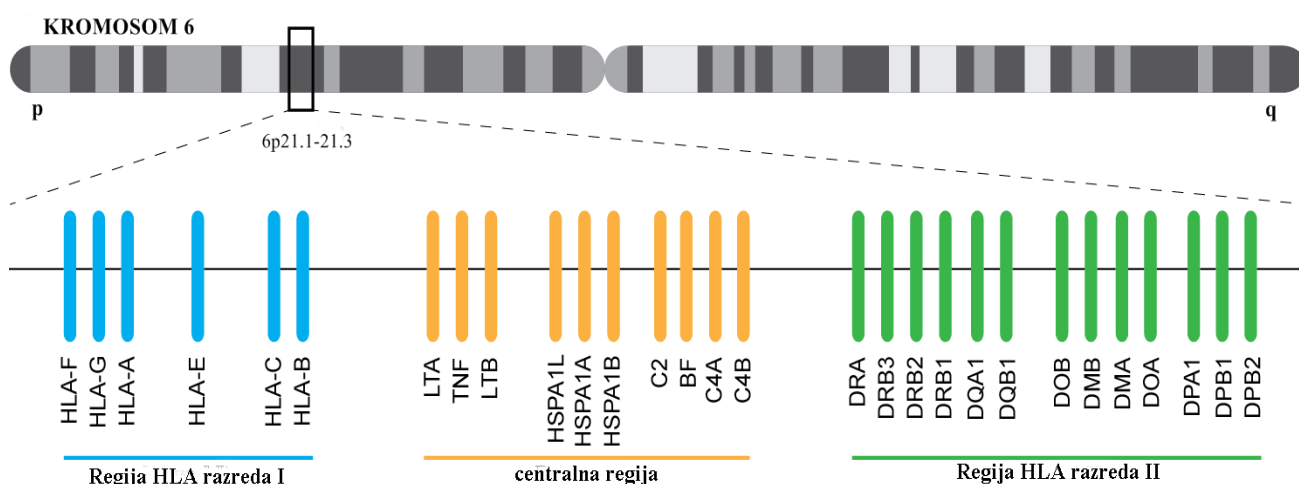
1.1. Glavni sustav tkivne snošljivosti

Glavni sustav tkivne snošljivosti ili sustav MHC (engl. *major histocompatibility complex*) visoko je specijalizirani genski sustav pronađen kod svih viših organizama (ribe, gmazovi, ptice i sisavci). Kod čovjeka je prvi puta otkriven sredinom prošlog stoljeća na površini leukocita i, sukladno tome, nazvan sustavom HLA (engl. *human leukocyte antigens*). Otkriće sustava HLA veže se uz francuskog znanstvenika Jean Dausset-a koji je istražujući grupe leukocita u serumu politransfundiranih osoba dokazao prisustvo staničnih aglutinina. Iste godine, Jon van Rood i Rose Payne ukazali su na postojanje leukocitnih aglutinina u serumu višerotkinja, i tim otkrićima postavljeni su temelji za daljnji rad i razvoj ovog područja [1].

Danas sustav HLA čini najintenzivnije istraživanu gensku regiju u čovjeka zbog izuzetne važnosti u transplantaciji tkiva i organa, populacijskim istraživanjima, praćenju migracija stanovništva, kao i u nastanku autoimunih bolesti. Ključna uloga sustava HLA, odnosno gena HLA, očituje se kroz funkciju njihovih najvažnijih produkata - molekula HLA. Smještene na membranama različitih stanica, molekule HLA sudjeluju u imunološkom prepoznavanju stranih antigena te aktivaciji i regulaciji imunološkog sustava. Zadaća imunološkog sustava je očuvanje biološkog integriteta jedinke sposobnošću razlikovanja vlastitog od tuđeg, a upravo molekule HLA važni su čimbenici u kontroli i regulaciji imunološkog sustava domaćina [2].

1.2. Genomska organizacija sustava

Sustav HLA jedna je od prvih kromosomskih regija koje su u potpunosti sekvencirane u projektu mapiranja ljudskog genoma. Smješten na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.1-21.3), zauzima područje od četiri milijuna parova baza što čini približno 1% ljudskog genoma. Obuhvaća skupinu usko vezanih gena, podijeljenih prema funkciji u 2 osnovne genske skupine: geni HLA razreda I i geni HLA razreda II (Slika 1).



Slika 1. Položaj i organizacija regije HLA na kromosomu 6. (Preuzeto s: [25]).

Regija HLA razreda I smještena je na telomeričnom kraju sustava i zauzima približno 2000kb. Obuhvaća 20-ak gena različitih funkcija, podijeljenih na: klasične gene, neklasične gene te pseudogene. Skupinu klasičnih gena HLA razreda I čine geni HLA-A, -B i -C, čiji su produkti, molekule HLA razreda I, izraženi na većini stanica s jezgrom, ali u različitim koncentracijama. Geni HLA-E, -F i -G dio su skupine neklasičnih gena HLA razreda I, a njihova zastupljenost ograničena je na tkivima i znatno su manjeg polimorfizma, te im je funkcija još nedovoljno istražena [3].

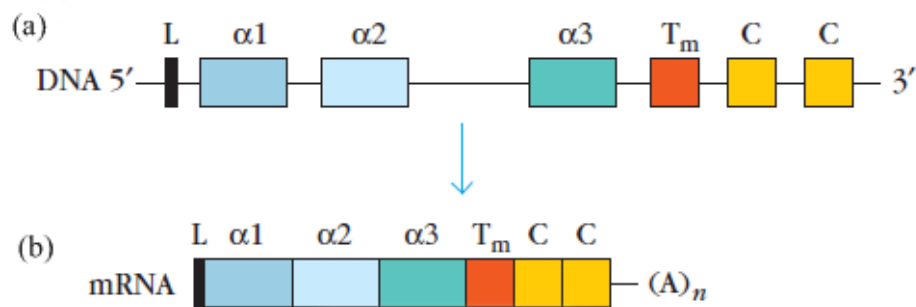
Na centromeričnom kraju sustava nalazi se regija HLA razreda II (približno 1000kb). Dijeli se u 6 genskih podregija: HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i -DR koje sadrže pripadajuće gene HLA razreda II. Podregije HLA-DP, -DQ i -DR kodiraju molekule HLA

razreda II izražene na membranama nekih stanica (npr. makrofagi, dendritičke stanice, ...) [4]. Preostale tri podregije (HLA-DM, -DN i -DO) kodiraju molekule koje nisu prisutne na membranama već u citoplazmi stanica, i uključene su u proces formiranja antigen predočnih molekula HLA razreda II. Unutar regije HLA razreda II nalaze se i geni potrebni za konačni ustroj molekula HLA razreda I, poput gena TAP1 i TAP2 (engl. *transporters associated antigen processing*) koji kodiraju dijelove proteinskih pumpa za prijenos antigenskih peptida iz citoplazme u endoplazmatski retikulum, te gena za proteasom čija je zadaća cijepanje antigenskih proteina na kraće peptide u citoplazmi [5].

Između regija HLA razreda I i razreda II smještena je centralna regija (približno 1000kb). Obuhvaća gene čiji produkti nisu direktno uključeni u prezentaciju antigena i regulaciju imunološkog odgovora, ali su važni čimbenici imunološke reakcije, kao primjerice sastavnice komponenata komplementa (C2, C4, faktor B), citokini TNF- α i TNF- β (engl. *tumor necrosis factors*), te proteini toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*) [3].

1.2.1. Građa gena HLA razreda I

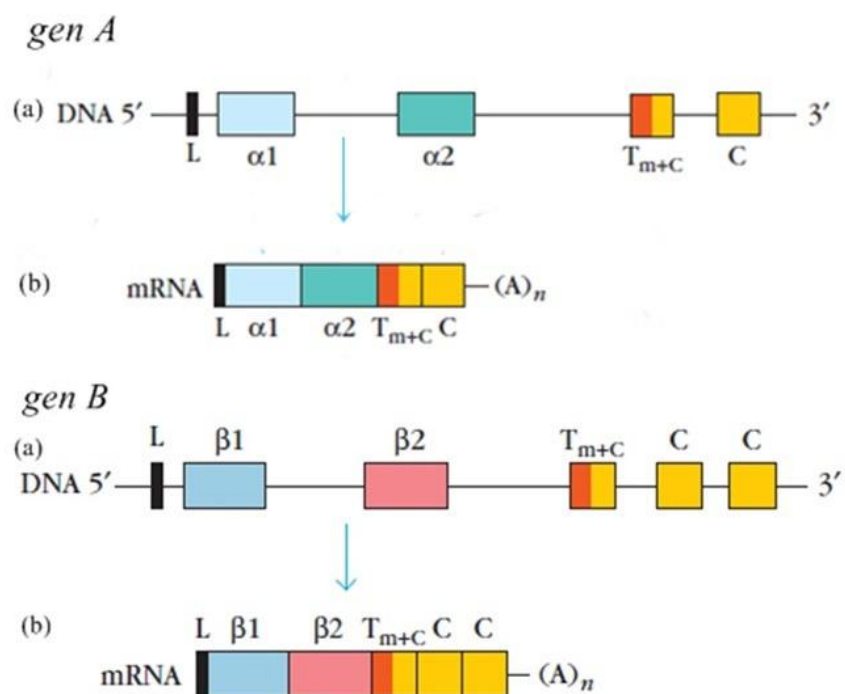
Geni HLA razreda I dio su imunoglobulinske genske porodice. Svaki gen HLA građen je od kodirajućih sekvenca (egzona) koje su razdvojene nekodirajućim sekvencama (intronima) različitih duljina. Klasični geni HLA razreda I sastoje se od 8 egzona te svaki egzon kodira drugu regiju teškog lanca (α lanca) molekule HLA razreda I (Slika 2) [5]. Prvi egzon sadržava vodeći slijed baza čiji produkt nakon translacije usmjerava protein u citoplazmu, a zatim se razgrađuje proteolitičkim enzimima i nije dio strukture gotove membranske molekule. Sljedeća tri egzona (egzon 2, 3 i 4) kodiraju izvanstanične domene teškog lanca ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$) molekule HLA razreda I. Egzon 5 kodira transmembransku regiju (Tm), dok egzoni 6 i 7 citoplazmastku regiju (C). Završni, netranslantirajući 3' kraj molekule kodiran je egzonom 8 [3]. Upravo najveći polimorfizam gena HLA razreda I nalazi se u egzonima 2 i 3 koji kodiraju domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$ i time pridonose varijabilnosti pukotine za vezanje prerađenih antigenskih ulomaka [6].



Slika 2. Shematski prikaz organizacije gena HLA razreda I prije (a) i nakon (b) izrezivanja introna. Vodeća sekvenca (L), sekvenca koja kodira transmembransku regiju (T_m), sekvenca koja kodira citoplazmatsku regiju (C). (Preuzeto i prilagođeno prema: [3]).

1.2.2. Građa gena HLA razreda II

Baš poput gena HLA razreda I, i geni HLA razreda II dio su imunoglobulinske genske porodice. Međutim, većina podregija HLA razreda II (osim podregija DO i DN) uvijek ima jedan aktivan gen A (npr. DQA1) i barem jedan aktivan gen B (npr. DQB1) [4]. Egzoni gena A određuju slijedove aminokiselina za sintezu domena teškog - α lanca, dok egzoni gena B kodiraju sintezu domena lakog - β lanca molekule HLA razreda II (Slika 3). Razlika između A i B gena HLA leži u njihovoj građi; geni A građeni su od 5 egzona, dok su geni B građeni od 6 egzona. Kod oba gena egzon 1 kodira vodeću sekvencu s istom ulogom kao i kod gena HLA razreda I; egzoni 2 i 3 izvanstanične domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$, odnosno domene $\beta 1$ i $\beta 2$. Egzon 4 kodira transmembranski i citoplazmatski dio lanca, a egzon 5 samo citoplazmatski. Razlika je u tome da gen B sadrži dodatan egzon za citoplazmatski dio lanca. Posljednji egzoni, u oba slučaja, kodiraju stop kodon [3]. Najveći broj razlika gena HLA razreda II nalazi se u egzonu 2 koji kodira izvanstanične domene $\alpha 1$ i $\beta 1$ te time pridonosi varijabilnosti aminokiselina u pukotini za vezanje peptida, a znatno više pridonose geni koji kodiraju β -lanac zbog većeg broja alela [6].



Slika 3. Shematski prikaz organizacije gena A i B HLA razreda II prije (a) i nakon (b) izrezivanja introna. Vodeća sekvenca (L), sekvenca koja kodira transmembransku i citoplazmatsku regiju (T_{m+C}), sekvenca koja kodira citoplazmatsku regiju (C). (Preuzeto i prilagođeno prema: [3]).

1.3. Antigen predložne molekule sustava HLA

S imunološkog gledišta molekule HLA ključni su produkti gena HLA. Kao što je već spomenuto, postoje dva razreda molekula HLA koje imaju ulogu u preradbi i predložavanju stranih, ali i vlastitih antigena T limfocitima, te važnu imunoregulacijsku funkciju. Ključne su u odabiru repertoara imunokompetentnih limfocita T koji odlaze na periferiju, dok se autoreaktivni limfociti T (vežu kompleks vlastiti peptid-molekula HLA s visokim afinitetom) uklanjaju apoptozom (programirana stanična smrt). Ovim procesom limfociti T postaju spregnuti na vlastito, tj. prepoznaju antigen samo kada je predložen u sklopu s vlastitim molekulama HLA na membranama stanica. Osim zajedničke funkcije, molekule HLA razreda I i razreda II međusobno se razlikuju u građi, u ekspresiji na različitim tipovima stanica, u veličini i vrsti peptida kojeg predložuju različitim subpopulacijama limfocita T te aktiviraju različite puteve imunološkog odgovora [5].

1.3.1. Građa i uloga molekula HLA razreda I

Molekule HLA razreda I membranski su heterodimeri građeni od dva nekovalentno vezana polipeptidna lanca. Teški, α lanac molekularne je mase oko 45 kDa i građen od tri dijela: transmembranski, citoplazmatski i izvanstanični dio s tri glikolizirane domene ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$) (Slika 4). Laki lanac molekule ($\beta 2$ -mikroglobulin), veličine 12 kDa, kodiran je genom izvan sustava HLA, na kromosomu 15. Nužan je za izražavanje molekule HLA razreda I na staničnoj površini i ne sudjeluje u prezentaciji peptida. Potpuna struktura molekule HLA razreda I, potrebna za njen stabilan izražaj na membranama stanica, jest heterotrimer sastavljen od dva spomenuta lanca i vezanog peptidnog ulomka. Domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$ oblikuju pukotinu sa zatvorenim dnom u koju se smješta peptid veličine 8-11 aminokiselina, a imunoglobulinu slična domena $\alpha 3$, evolucijski je vrlo konzervirana i vezno je mjesto za molekulu CD8 citotoksičnih limfocita T [3, 5].

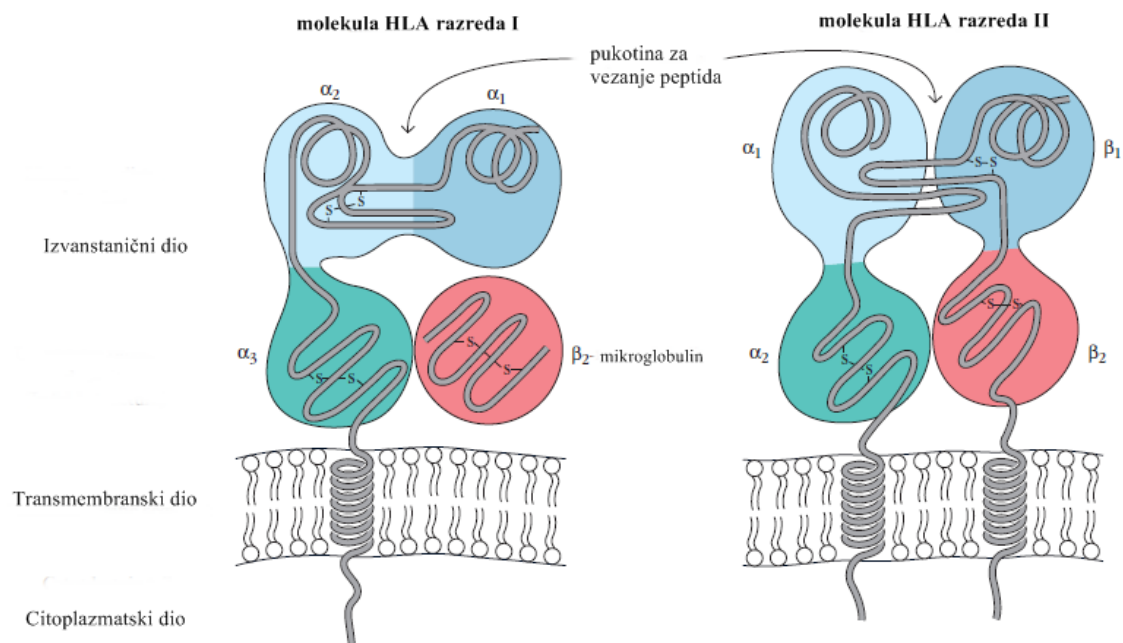
Molekule HLA razreda I smještene su na membranama gotovo svih stanica s jezgrom i predložuju prerađene unutarstanične antigene poput virusnih peptida, peptida drugih unutarstaničnih patogena ili tumorskih antigena i sl., CD8⁺ citotoksičnim T limfocitima

mehanizmom tzv. spregnutog prepoznavanja. Prepoznavanje stranog antigena u kompleksu s vlastitom molekulom HLA dovodi do aktivacije citotoksičnog limfocita T i lučenja perforina, granzima, serin proteaza i drugih lizina uzrokujući apoptozu ciljne stanice. Istovremeno, luči se i mnogo različitih citokina, od kojih je najvažniji interleukin 2 jer potiče klonsku ekspanziju aktiviranih citotoksičnih limfocita T te pojačava aktivnost stanica NK, prirodnih ubojica (engl. *natural killer*), što vodi u razvoj stanične imunosti [3, 5].

1.3.2. Građa i uloga molekula HLA razreda II

Molekule HLA razreda II također su membranski glikoproteini građeni od dva nekovalentno vezana lanca: teškog, α lanca i lakog, β lanca kodiranih različitim genima HLA razreda II (gen A, odnosno gen B). Lanac α (33-35 kDa) i lanac β (26-28 kDa) međusobno su slične strukture te, poput α lanca molekula HLA razreda I, sastoje se od tri dijela: transmembranski, citoplazmatski i izvanstanični dio s dvije glikolizirane domene ($\alpha 1$ i $\alpha 2$, odnosno $\beta 1$ i $\beta 2$) (Slika 4) [4]. Domene $\alpha 1$ i $\beta 1$ tvore pukotinu za vezanje peptida tako da su krajevi pukotine otvoreni što omogućuje vezanje većih peptida (10-30 aminokiselina). Imunoglobulinu sličan dio molekule HLA razreda II tvore domene $\alpha 2$ i $\beta 2$, važne za nekovalentno povezivanje i stabilnu strukturu lanaca. Slično kao i kod molekula HLA razreda I, stabilnu strukturu molekule HLA razreda II čini heterotrimer sastavljen od α lanca, β lanca i vezanog peptidnog ulomka [3, 5].

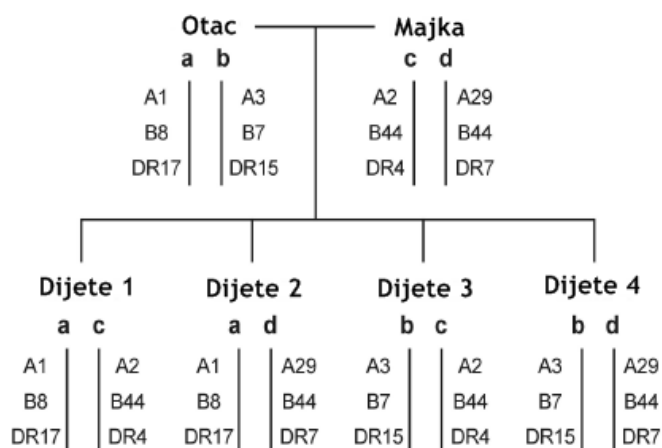
Molekule HLA razreda II konstantno su izražene na membranama profesionalnih antigen predočnih stanica (makrofagi, dendritičke stanice, B limfociti), a različiti citokini mogu potaknuti njihovu ekspresiju na površini limfocita T, epitelnih i endotelnih stanica. Predočuju izvanstanične antigene, poput bakterijskih peptida, koji se fagocitozom ili endocitozom posredovanom receptorima unose u predodne stanice te se razgrađuju i prezentiraju $CD4^+$ pomoćničkim limfocitima T. Prepoznavanje se također odvija spregnuto, vezanjem antigenskog receptora za peptid i molekule $CD4$ za $\beta 2$ domenu molekule HLA razreda II što vodi u aktivaciju pomoćničkog limfocita T i, u ovom slučaju, do pokretanja humoralne imunosti [3, 5].



Slika 4. Shematski prikaz građe molekula HLA razreda I i razreda II. (Preuzeto i prilagođeno prema: [3]).

1.4. Osobitosti sustava HLA

Pojedina kombinacija alternativnih oblika gena HLA, tj. alela HLA, na jednom kromosomu 6 tvori haplotip i svi aleli HLA jednog haplotipa nasljeđuju se zajedno. Nasljeđivanje gena, točnije haplotipova HLA, odvija se prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja - po jedan haplotip HLA nasljeđuje se od svakog roditelja (Slika 5), a produkti gena oba haplotipa HLA kodominantno su izraženi na staničnim membranama [7]. Prema tome, HLA heterozigotna osoba na stanicama eksplicira šest različitih klasičnih molekula HLA razreda I (HLA-A, -B, -C) i šest ili više različitih klasičnih molekula HLA razreda II (HLA-DR, -DQ, -DP) [8].



Slika 5. Shematski prikaz nasljeđivanja gena, odnosno haplotipova HLA u obitelji. (Preuzeto i prilagođeno prema: [7]).

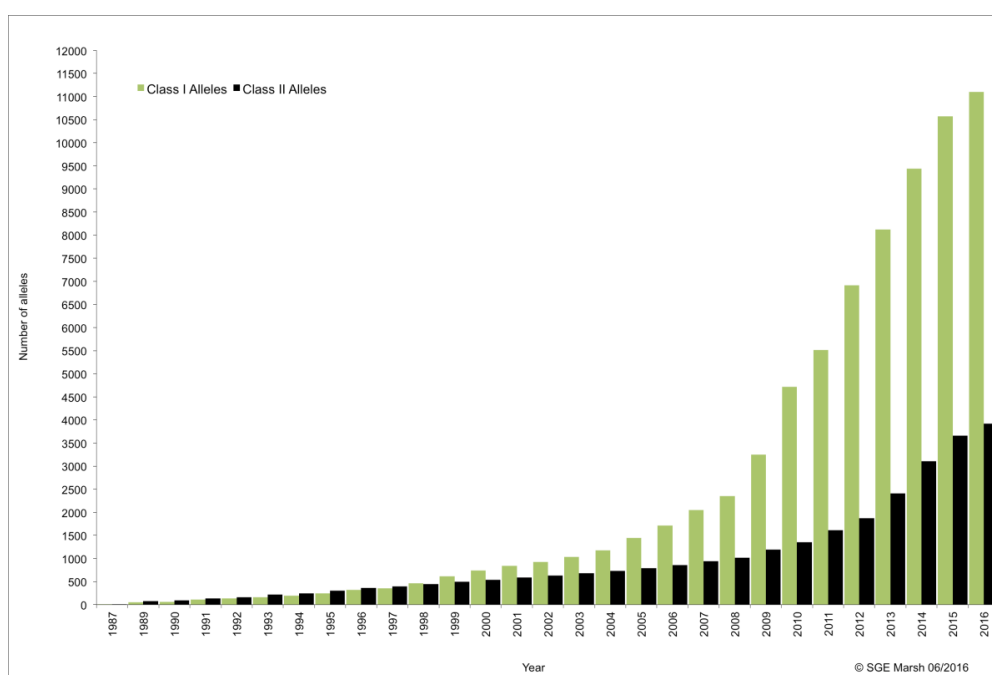
1.4.1. Krosingover - rekombinacija

Zbog iznimno male udaljenosti između pojedinih lokusa HLA, izuzetno je rijetka izmjena genetičkog materijala (krosingover), odnosno rekombinacija gena HLA i stvaranje novih haplotipova HLA. Međutim, do krosingovera ipak može doći tijekom oogeneze ili spermatogeneze, a sama učestalost ovisi isključivo o udaljenosti između dva lokusa HLA. Naime, učestalost krosingovera veća je što su geni međusobno više udaljeni, i obratno. Tako

primjerice, učestalost rekombinacije između lokusa HLA-A i -B iznosi 0,8%, dok je između lokusa HLA-DRB1 i -DQB1 izuzetno rijetko uočena. Načelno, stopa rekombinacije između gena HLA vrlo je mala i ne pridonosi značajno genetičkoj varijabilnosti sustava HLA [6, 7].

1.4.2. Polimorfizam

Polimorfizam, odnosno velik broj alela HLA glavno je obilježje sustava HLA. Do danas je otkriveno više od 200 gena i više od 15,000 alela HLA što čini ovaj sustav najpolimorfnijim genskim sustavom u čovjeka (Slika 6) [8]. Golemi polimorfizam ostvaruje se raznim genskim mehanizmima, posebice točkastim mutacijama, genskim konverzijama i već spomenutom rekombinacijom. Time je osigurana raznolikost gena i molekula HLA između jedinka iste vrste, ali i između različitih vrsta. Raznolikost molekula HLA omogućuje vezanje širokog spektra antigenskih peptida te evolucijski predstavlja prednost u borbi protiv različitih uzročnika bolesti. Što je veća raznolikost molekula HLA, manja je mogućnost da neki strani antigeni izbjegnu imunološki sustav [5].



Slika 6. Broj otkrivenih alela HLA razreda I i razreda II do VII/2016. (Preuzeto s: [26]).

Veću raznolikost pokazuju aleli HLA razreda I s najpolimorfnijim genom HLA-B, dok je najpolimorfniiji lokus razreda II HLA-DRB1 (Tablica 1) [26]. Međutim, polimorfizam nije ravnomjerno raspoređen cijelom dužinom gena, tj. u svim egzonima i intronima, već je većina razlika između pojedinih alela ograničena na domene koje oblikuju pukotine za vezanje peptida. Spomenuti genski mehanizmi dovode do promjene jednog ili nekoliko nukleotida egzona, što rezultira ugradnjom drugih aminokiselina [6, 8]. Zamjena samo nekoliko aminokiselina tih domena uzrokuje promjenu u trodimenzionalnoj strukturi pukotine za vezanje peptida, što znatno utječe na afinitet molekule HLA prema peptidima. Kako se peptidi međusobno razlikuju u obliku i karakteristikama, važno je da postoji veliki repertoar molekula HLA različitog afiniteta kako bi se osiguralo vezanje svih tih peptida patogena iz okoline [9]. To upućuje na pretpostavku da se raznolikost gena, odnosno molekula HLA, održava izravno selekcijom putem različitih patogena, što utječe na varijaciju distribucije i frekvencije alela između geografskih regija, ali i između populacija [7].

Tablica 1. Broj do sada imenovanih alela najpolimorfnijih lokusa HLA. (Preuzeto i prilagođeno prema: [26]).

Regija	Lokus	Broj alela	Ukupno
HLA razred I	HLA-A	3492	11,100
	HLA-B	4358	
	HLA-C	3111	
HLA razred II	HLA-DRB1	1929	3,920
	HLA-DQB1	940	
	HLA-DPB1	671	

Raspodjela alela HLA i njihova učestalost u brojnim populacijama svijeta određuju se populacijskim istraživanjima. Iako je ukupan broj alela HLA velik, unutar pojedine populacije javlja se znatno manji broj alela. Na temelju dosadašnjih rezultata populacijskih istraživanja, aleli HLA se prema učestalosti mogu podjeliti u tri skupine [10]:

- aleli HLA s relativno visokom učestalošću u svim populacijama
- aleli HLA uočeni u većini populacija, ali sa različitom učestalošću
- aleli HLA specifični samo za neku populaciju

Također, postoji i druga podjela alela HLA s obzirom na njihovu učestalost u populacijama, to su: „*common*“ (aleli uočeni više od tri puta u barem tri različite populacije), „*well-documented*“ (aleli uočeni barem pet puta u ukupnom broju populacija) i „*rare*“ (aleli uočeni manje od 3 puta u ukupnom broju do danas istraženih populacija) [11].

Analiza učestalosti alela HLA u populacijama pokazala je da se neki aleli javljaju s visokom učestalošću u većini populacija (Tablica 2). Jedan od takvih je zasigurno alel HLA-A*02:01 koji je ujedno i najčešći alel na lokusu HLA-A u populacijama evropskog porijekla, a samim time i u hrvatskoj populaciji [12]. Na lokusu HLA-B u većini populacija u svijetu uočeni su aleli HLA-B*35:01 i B*51:01, dok su za lokus HLA-DRB1 česti gen HLA-DRB1*11 (s najčešćim alelima DRB1*11:01 i DRB1*11:04) i gen HLA-DRB1*01. Naime, osim što postoji razlika u učestalosti gena HLA, odnosno alela HLA među populacijama različitih geografskih područja, isto tako uočena je i regionalna razlika, kao što je to primjerice na području Evrope, gdje aleli HLA pokazuju rast ili pad učestalosti od sjevera prema jugu, odnosno od zapada prema istoku [10].

Tablica 2. Pet najučestalijih alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1 u dvije populacije evropskog porijekla i u Hrvatskoj. Aleli HLA koji nisu prisutni u sve tri populacije u skupini pet najčešćih alela (*), učestalost alela HLA (F), prilagođeno prema [13] ⁽¹⁾, prilagođeno prema [14] ⁽²⁾, prilagođeno prema [12] ⁽³⁾.

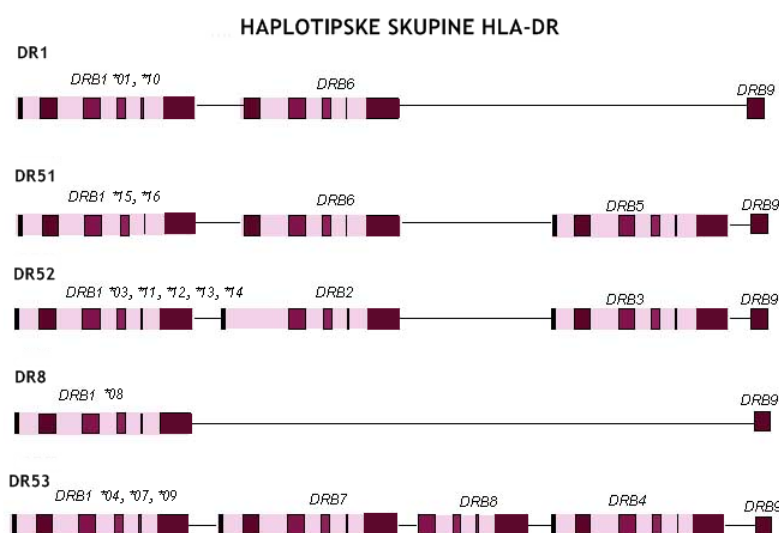
Aleli	Amerikanci evropskog porijekla ¹	Amerikanci istočno-evropskog porijekla ²	Hrvatska ³
HLA-A*	F (%)	F (%)	F (%)
01:01	17,2	14,2	12,4
02:01	29,6	27,5	29,2
03:01	14,3	12,9	11,8
11:01	5,6	6,3	6,9
24:02	8,7	10,2	11,0
HLA-B*	F (%)	F (%)	F (%)
07:02	14,0	10,4	6,8
08:01	12,5	9,1	7,8
15:01*	6,7	5,6	-
18:01*	-	-	8,2
35:01	5,7	6,5	6,1
44:02:01G*	9,0	6,4	-
51:01*	-	-	11,1
HLA-DRB1*	F (%)	F (%)	F (%)
01:01	9,1	9,3	9,8
03:01	12,9	10,2	10,0
04:01*	9,1	6,8	-
07:01	13,8	12,5	9,4
15:01	14,4	11,0	8,7
16:01*	-	-	9,4

1.4.3. Genska neravnoteža udruživanja

Na temelju ukupnog broja alela HLA pojedinog genskog lokusa i broju gena HLA koji čine jedan haplotip HLA, uzimajući u obzir da svaki haplotip HLA sadrži gene razreda I i razreda II, potencijalan broj mogućih kombinacija alela HLA reda je veličine 10^{18} . Međutim, takav izračun podrazumijeva pretpostavku da je kombinacija alela jednog haplotipa u potpunosti nasumična. Stvaran broj mogućih haplotipova HLA znatno je manji jer se aleli bliskih lokusa HLA javljaju u zajedničkom haplotipu češće nego što je to za očekivati s obzirom na njihovu pojedinačnu gensku učestalost. To obilježje naziva se neravnoteža udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, *LD*). Iako se sa sigurnošću ne zna mehanizam ovog fenomena, postoji nekoliko teorija koje pokušavaju dati odgovor. Prema najjednostavnijoj teoriji haplotipovi koji su najzastupljeniji u populaciji odraz su kombinacija alela „osnivača“, i predstavljaju najstarije, tj. ancestralne haplotipove određene populacije. Nadalje, određene kombinacije alela imaju pozitivnu selekcijsku prednost u imunološkom smislu, pa su učestalije u populaciji. I prema trećoj teoriji, unutar DNA postoje regije naklonjenije krosingoveru (engl. *hotspots*), a prisustvo ili nedostatak takve regije između alela određuje učestalost udruživanja [3, 9]. Najsnažnija neravnoteža udruživanja uočena je između bliskih lokusa HLA (npr. HLA-B-C, HLA-DRB1-DQB1 ili HLA-DQA1-DQB1), ali i između udaljenijih lokusa HLA razreda I i II (npr. HLA-B-DRB1). Suprotno tome, vrlo slab LD uočen je između HLA-DPB1 i -DQB1, vjerojatno zbog češćih rekombinacija između ta dva genska lokusa [10].

1.5. Organizacija podregije HLA-DR

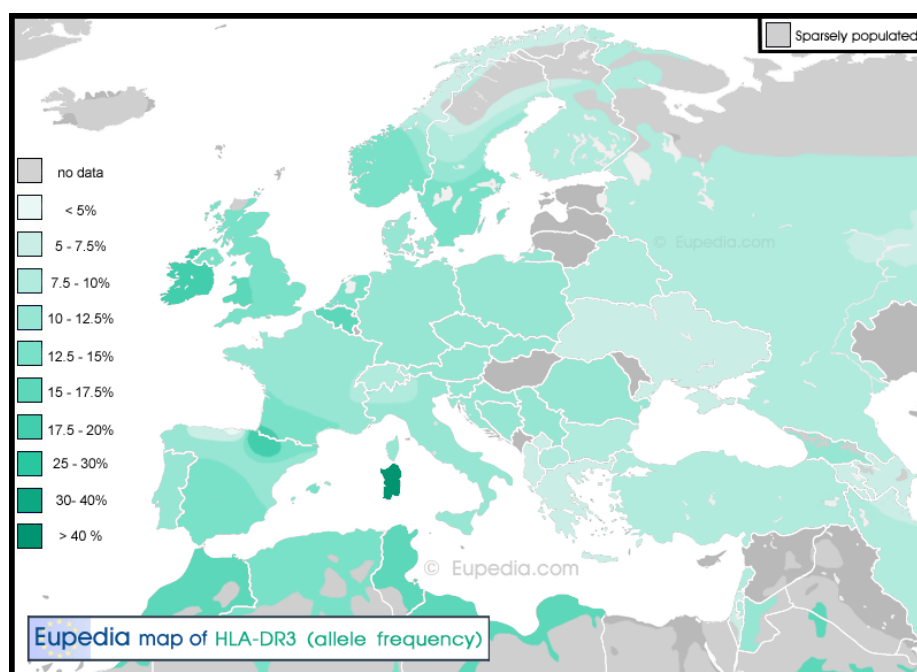
Kao što je spomenuto, pojedina podregija HLA razreda II uglavnom uvijek ima dva aktivna gena: gen A i gen B. Iznimka je podregija HLA-DR koja jedina može imati više aktivnih gena B. Sveukupno, postoji devet gena HLA-DRB, od kojih su četiri gena funkcionalna (HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 i -DRB5), a preostali su nefunkcionalni geni, odnosno pseudogeni (HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 i -DRB9) [27]. Unutar podregije HLA-DR kod svih osoba uvijek je aktivan gen HLA-DRA1 koji kodira α lanac molekule HLA-DR i gen HLA-DRB1 koji kodira β lanac molekule HLA-DR. Ovisno o alelu na lokusu HLA-DRB1 na istom kromosomu 6 može biti prisutan jedan od preostala tri funkcionalna gena HLA-DRB (HLA-DRB3, -DRB4 ili -DRB5). Tako primjerice, kada je u haplotipu prisutan gen DRB1*03, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13 ili DRB1*14, bit će prisutan i gen DRB3 koji kodira β lanac molekule HLA-DR52 [15]. Sveukupno postoji pet glavnih haplotipskih skupina HLA-DR (Slika 8) i pretpostavlja se da je različiti broj gena HLA-DRB rezultat duplikacija i rekombinacija tijekom evolucije [16].



Slika 8. Shematski prikaz pet glavnih haplotipskih skupina HLA-DR. Egzoni i introni gena HLA-DRB prikazani su kućicama obojenim različitim nijansama ljubičaste boje. (Preuzeto i prilagođeno prema: [17]).

1.6. Gen HLA-DRB1*03

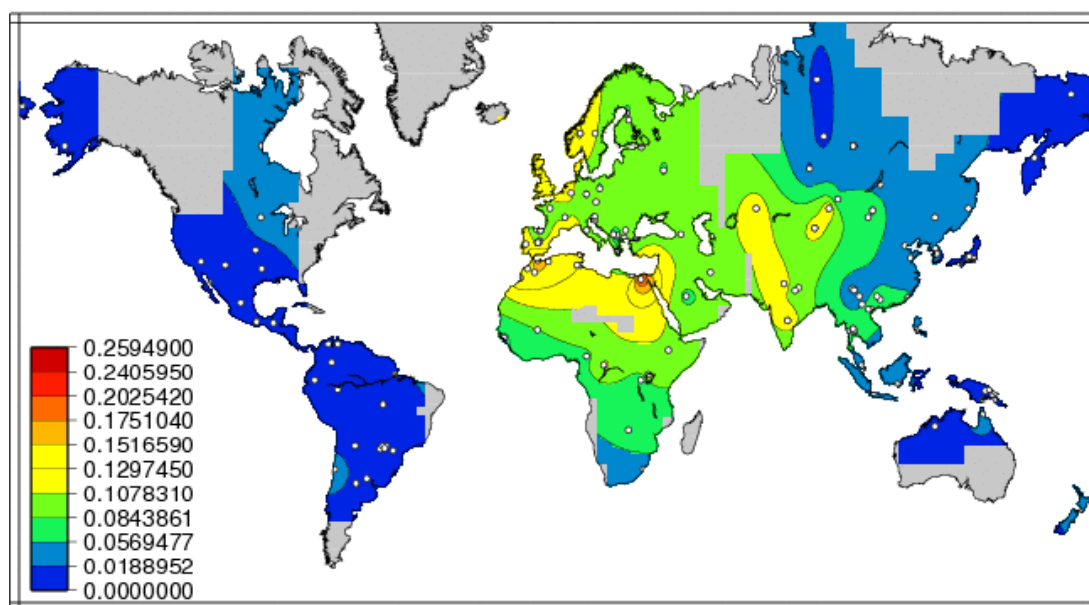
Gen HLA-DRB1 kodira velik broj funkcionalno varijabilnih genskih produkata koji se prema specifičnosti dijele u nekoliko HLA-DR serotipova (DR1-DR18). Sam gen HLA-DRB1*03 kodira antigensku skupinu HLA-DR3 koja se prema specifičnosti dijeli na dva serološka ekvivalenta: HLA-DR17 (genski produkti alela DRB1*03:01 i *03:04) i HLA-DR18 (genski produkti alela HLA-DRB1*03:02 i *03:03) te se s različitom učestalošću javlja između pojedinih regija (Slika 9) [17].



Slika 9. Distribucija gena HLA-DR3 u Evropi, na Bliskom Istoku i u sjevernoj Africi. (Preuzeto s: [28]).

Prema bazi podataka IPD-IMGT/HLA do srpnja 2016. otkriveno je 167 različitih alela HLA-DRB1*03 (*03:01-*03:132), od kojih su aleli HLA-DRB1*03:67N i HLA-DRB1*03:68N *null* aleli, odnosno nemaju ekspresiju na staničnim membranama, a preostali su aktivni i kodiraju molekule izražene na staničnim membranama [26]. Široko rasprostranjeni alel gena HLA-DRB1*03 je alel DRB1*03:01 prisutan u većini populacija evropskog porijekla gdje se javlja s visokom učestalošću, dok na području same Evrope

pokazuje pad učestalosti od sjevera prema jugu (Slika 10). U Hrvatskoj, gen HLA-DRB1*03, s jednim alelom DRB1*03:01, javlja se s učestalošću od 10% i najčešći je gen lokusa HLA-DRB1 [12].



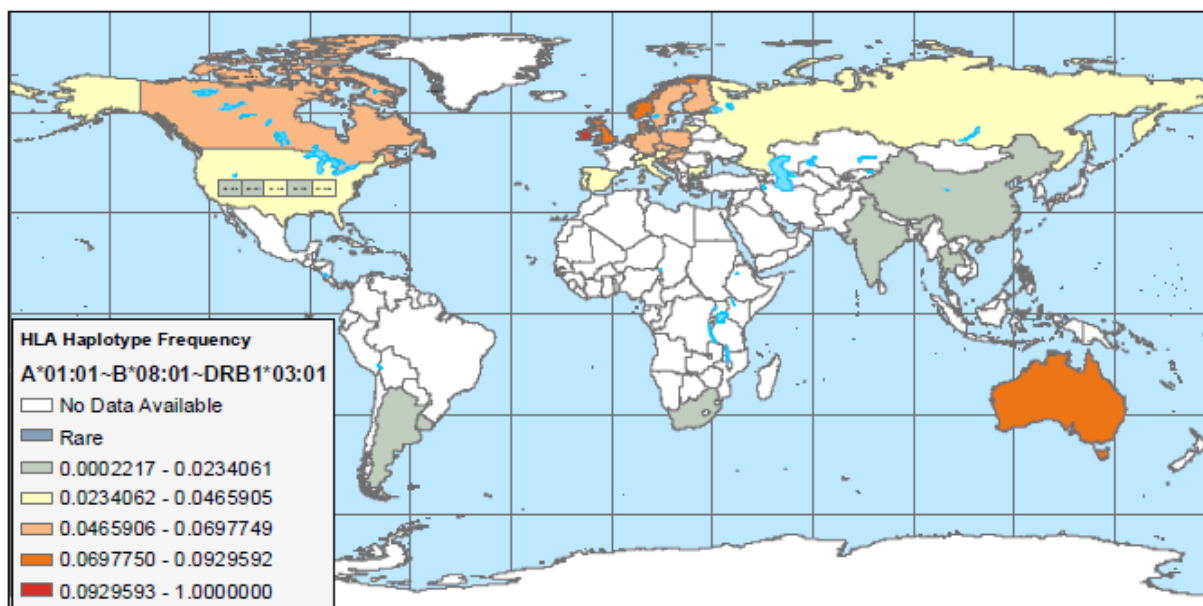
Slika 10. Raspodjela alela HLA-DRB1*03:01 u svijetu. (Preuzeto s: [29]).

Gen HLA-DRB1*03 dio je ancestralnog evropskog haplotipa HLA-A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 za kojeg se pretpostavlja da je ostao evolucijski očuvan posljednjih 40 milijuna godina te da su iz njega genskim mehanizmima nastali evolucijski mlađi haplotipovi [18]. Pojedini geni ovog haplotipa, kao što je gen HLA-DRB1*03, često se povezuju s nastankom autoimunih bolesti, dok različiti aleli istog gena mogu drugačije utjecati na ishod bolesti. Iako se ne zna točan mehanizam djelovanja gena HLA u smjeru nastanka autoimunih bolesti, dosadašnje spoznaje jasno ukazuju da su predočavanje antigena te sazrijevanje i aktivacija limfocita T važni faktori u pokretanju autoimunog odgovora, a upravo u tim procesima molekule HLA igraju ključnu ulogu [19].

1.6.1. Haplotipovi alela HLA-DRB1*03:01

Alel HLA-DRB1*03:01 pokazuje izrazito snažan LD s lokusom HLA-DRB3 te se uvijek nasljeđuju zajedno u haplotipu **HLA-DRB1*03:01-DRB3**. U svijetu postoji 121 alel HLA-DRB3 (*01:01-*01:39, *02:01-*02:54, *03:01-*03:11), s time da se populacije međusobno razlikuju u alelima na lokusu HLA-DRB3. Primjerice, istraživanja kod populacija azijskog porijekla pokazala su da se DRB1*03:01 najčešće pojavljuje s alelom DRB3*02:02, dok kod populacija evropskog porijekla najčešće formira haplotip s alelom DRB3*01:01 i alelom DRB3*02:02 [16].

Nadalje, tipizacijom gena HLA-A i -B koji dolaze u haplotipu s HLA-DRB1*03-DRB3, uočen je snažan LD s alelima HLA-A*01:01 i HLA-B*08:01 te oni zajedno čine haplotip **HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01**. To je najčešći haplotip u populacijama evropskog porijekla, isto tako i u Hrvatskoj (4,15%), ali i u drugim populacijama je na visokoj poziciji po učestalosti (Slika 11) zbog činjenice da je dio prije spomenutog ancestralnog evropskog haplotipa [12].



Slika 11. Raspodjela haplotipa HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 u svijetu. (Preuzeto s: [30]).

Uočena je povezanost ovog haplotipa HLA i pojedinih autoimunih bolesti (sistemski eritemski lupus, šećerna bolest tip 1, glutenska enteropatija, mijastenija gravis, Gravesova bolest,...) u mnogim populacijama u svijetu te je sukladno tome nazvan tzv. autoimunim haplotipom. Rizik za razvoj autoimune bolesti određen je kombinacijama alela pojedinih lokusa unutar haplotipa HLA, a sami aleli HLA mogu biti podložni ili protektivni kod razvoja neke autoimune bolesti. Primjerice, molekula HLA-DR3 podložna je molekula za razvoj autoimune Gravesove bolesti. Međutim, kao što je rečeno, razvoj bolesti ovisi o kombinaciji više alela koji se nalaze unutar istog haplotipa: npr. geni HLA-B*08 i HLA-C*07 smatraju se podložnima za razvoj bolesti, dok su geni HLA-C*16, HLA-C*03, HLA-B*44 i HLA-DRB1*07 protektivni u slučaju Gravesove bolesti. Istraživanja Gravesove bolesti pokazala su da molekula HLA-DR3 sadrži pozitivno nabijeni arginin na poziciji β 74, dok molekula HLA-DR7 (produkt gena HLA-DRB1*07) na toj istoj poziciji nosi ne nabijeni polarni glutamin. Promjena naboja u pukotini za vezanje peptida može rezultirati promjenom u predočavanju peptida i sazrijevanju limfocita T, što može voditi do izmjene tolerancije prema vlastitim antigenima i razvoja autoimunosti. Načelno, molekule HLA, najčešće u kombinaciji s drugim genetičkim i okolišnim čimbenicima, mogu dovesti do greške u najvažnijoj funkciji imunološkog sustava - razlikovanju vlastitih antigena od stranih [19].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Analizirati haplotipove HLA-A-B-DRB1*03:01 u Hrvatskoj.
2. Istražiti raspodjelu haplotipova HLA-DRB1*03:01-DRB3 u ispitivanoj skupini.
3. Utvrditi postoje li razlike u kombinaciji HLA-DRB1*03:01-DRB3 s obzirom na alele HLA-B i HLA-A.
4. Usporediti dobivene rezultate s podacima iz literature i utvrditi postoji li razlika između Hrvatske i drugih populacija evropskog porijekla.

3. MATERI JAL I METODE

3.1. Materijal

Istraživanje je provedeno na dvije skupine ispitanika. Prva skupina obuhvatila je grupu od 157 obitelji u kojima je jedan od roditelja bio pozitivan za alel DRB1*03:01, a segregacijom su im određeni haplotipovi HLA-A-B-DRB1*03:01.

Drugu skupinu sačinjavala je grupa od 73 nesrodna ispitanika pozitivna za alel DRB1*03:01 koji su testirani za polimorfizam gena DRB3. Jedan od preduvjeta za uključivanje ispitanika u ovu skupinu je da na drugom kromosomu 6 nema niti jedan alel iz haplotipske skupine DR52. Ispitanicima iz druge skupine također su određeni aleli na lokusima HLA-A i -B.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija DNA

Svim ispitanicima uključenim u istraživanje izolirana je DNA iz 2 mL periferne krvi pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (Nucleospin[®], Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Komercijalni set za izolaciju sastoji se od: pufera B1, B5, BW, BE i B3, reagensa B2, proteinaze K te Nucleospin epruvete i kolone. Ova metoda koristi se za izolaciju genomske DNA iz uzorka, a zasniva se na specifičnom vezanju molekule DNA na silikatnu membranu unutar Nucleospin kolone.

3.2.2. Tipizacija gena HLA-A, -B i -DRB1

Aleli lokusa HLA-A, -B i -DRB1 određeni su metodom PCR-SSO (*engl. polymerase chain reaction - sequence specific oligonucleotides*) koja se temelji se na umnožavanju specifičnog odsječka DNA pomoću početnica obilježenih biotinom. Umnožena DNA (amplikoni) zatim se hibridizira s različitim mikrosferama (polistirenske kuglice veličine 5,6 mikrona s crvenim ili infracrvenim fluorokromom u unutrašnjosti) za čiju su površinu vezane sonde DNA specifične za određene alele HLA. Po završetku hibridizacije, reakcijskoj smjesi dodaje se fluorescentna boja SAPE (*engl. streptavidin phycoerythrin*), a interakcija između boje SAPE i biotina događa se samo u slučaju kada je došlo do specifičnog vezanja određene DNA sonde za komplementaran slijed nukleotida na amplikonima. Očitavanje pozitivnih i negativnih hibridizacijskih reakcija provodi se Luminex aparatom pomoću kojeg se detektira fluorescencija i određuju se DNA sonde koje su se vezale na uzorak DNA. Rezultati ove metode analiziraju se programom Quicktype for Lifecodes 3.0 (IMMUCOR®) te se time određuju aleli HLA na niskoj ili srednjoj rezoluciji. Niska rezolucija podrazumijeva molekularnu tipizaciju HLA na razini gena, tj. na dvije znamenke (npr. A*02).

3.2.3. Tipizacija gena HLA-DRB3

Metodom PCR-SSP (*engl. polymerase chain reaction - sequence specific primers*) tipizirani su geni HLA-DRB3. Metoda se temelji na umnožavanju određenog odsječka DNA početnicama specifičnim za pojedini alel ili skupinu alela HLA. Parovi početnica vežu samo komplementarne sljedove DNA te je umnožavaju, a umnoženi produkti predstavljaju specifično umnožene alele pojedinog gena HLA. Test, osim liofiliziranih specifičnih početnica, sadrži i kontrolne početnice koje služe kao pozitivna kontrola za svaku reakciju. Kontrolne početnice vežu konzervirane regije gena za hormon rasta, koji je kod ljudi prisutan u svim uzorcima DNA. Amplikoni nastali specifičnim vezanjem početnica HLA kraći su od amplikona nastalih vezanjem pozitivnih kontrolnih početnica. Ova metoda je osjetljiva i koristi se za tipizaciju tkiva visoke rezolucije. Visoka rezolucija podrazumijeva molekularnu tipizaciju HLA na razini alela, tj. na četiri znamenke (npr. A*02:01).

Za tipizaciju gena HLA-DRB3 korišten je komercijalni set *OlerupSSP DRB3-SSP* (GenoVision Inc, West Chester, PA, US). Test se sastoji od 31+1 reakcije gdje je zadnja

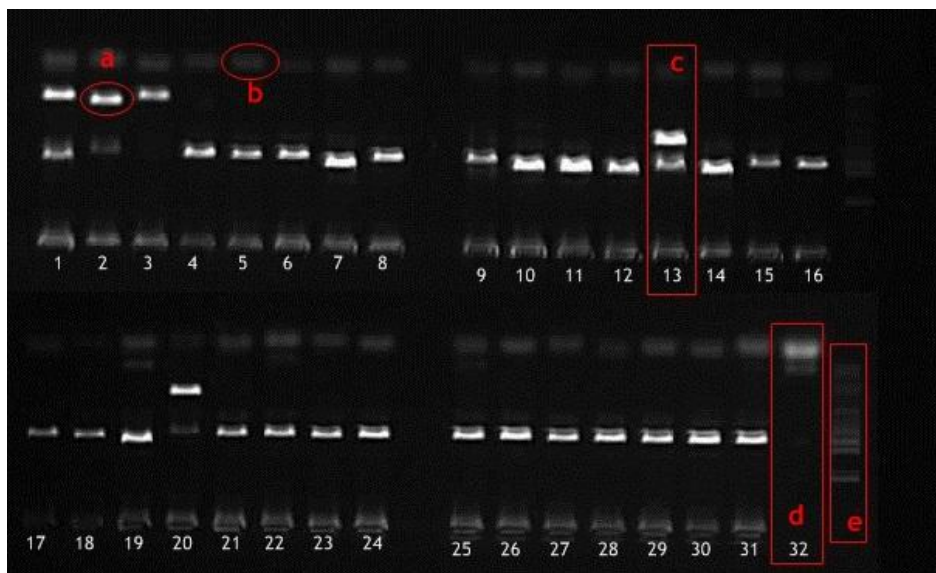
reakcija negativna kontrola. Za pripremu reakcijske smjese jednog testa korišteno je: 51 μ L reakcijskog pufera s Taq polimerazom (*OlerupTM PCR Master Mix + Taq DNA polimerase*) i 85 μ L destilirane vode. Po 4 μ L reakcijske smjese je razdijeljeno u 32 jažice seta i u sve jažice (osim u negativnu kontrolu) dodano je 1 μ L uzorka DNA koncentracije 20 ng/mL. Umnožavanje DNA provedeno je u uvjetima prikazanim u Tablici 3.

Tablica 3. Program za umnožavanje DNA.

Korak	Brok ciklusa	Temperatura	Vrijeme inkubacije
1	1	94 °C	2 min
2	10	94 °C	10 sec
		65 °C	60 sec
3	20	94 °C	10 sec
		61 °C	50 sec
		72 °C	30 sec

Provjera veličine amplikona provedena je elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu (3 g agaroze + 200 mL 1xTBE pufera) obojenim fluorescentnom DNA bojom GelRed (GenoVision Inc, West Chester, PA, US). Pipetom je nanošeno 5 μ L uzoraka u jažice gela, a u posljednju jažicu nanoseno je 5 μ L markera veličine (*DNA size marker, OlerupSSP*). Elektroforeza je provedena u trajanju od 20 min u uvjetima 149 Wat/237 V/330 mA pri čemu produkti PCR-a putuju različitom brzinom kroz gel ovisno o njihovoj veličini.

Gel je slikan pomoću UV G:BOX Syngene kamere s tamnom komorom. Svaka reakcija je ovisno o dobivenim rezultatima označena kao pozitivna (vidljiva vrpca PCR produkta i pozitivne kontrole) ili kao negativna (vidljiva samo vrpca pozitivne kontrole, bez PCR produkta) (Slika 12). Interpretacija rezultata temeljena je na specifičnosti reakcija označenih kao pozitivne reakcije, a aleli gena HLA-DRB3 određeni su pomoću kompjuterskog programa Helmberg Score.



Slika 12. Prikaz rezultata određivanja alela gena HLA-DRB3 na agaroznom gelu. Uzorci 1, 2, 3, 13 i 20 predstavljaju pozitivne reakcije sa specifično umnoženim PCR produktom, dok su preostale reakcije negativne. Specifično umnožen PCR produkt (a), dimeri (b), pozitivna reakcija (c), negativna kontrola (d), marker veličine (e).

3.2.4. Statistika i obrada podataka

Haplotipovi HLA-A-B-DRB1*03:01 unutar prve skupine ispitanika, tj. u obiteljima, određeni su segregacijom, praćenjem nasljeđivanja usporedbom alela HLA između roditelja i djece i predstavljaju prave haplotipove. Unutar druge skupine nije bilo moguće odrediti prave haplotipove HLA-A-B-DRB1*03:01 jer je riječ o nesrodnim ispitanicima te smo ovu skupinu u daljnjim analizama dijelili na temelju prisustva/odsustva alela HLA-B*08:01. Naime, na osnovu vrlo dobro poznatih podataka o jakom LD-u između alela HLA-B*08:01 i HLA-DRB1*03:01, prepostavili smo da su oni u zajedničkom haplotipu (tzv. prepostavljeni haplotip HLA). Isto tako, kod ispitanika koji su uz navedene alele imale i alel A*01:01, prepostavili smo da oni tvore haplotip HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 koji pokazuje jednu od najjačih neravnoteža udruživanja u populacijama evropskog porijekla.

Učestalosti alela i haplotipova HLA među ispitanicima određene su metodom izravnog brojanja. Usporedba u raspodijeli alela i haplotipova HLA s drugim evropskim populacijama, utvrđena je upotrebom Hi-kvadrat testa (χ^2 testa) pri čemu je razina statističke značajnosti, odnosno vrijednost p bila 0,05. Podaci o učestalosti haplotipova utvrđeni su programom HaploStats.

4. REZULTATI

4.1. Raspodjela alela HLA-A, -B, -DRB1 i haplotipova koje tvore u skupini obitelji

Sveukupno 350 obitelji tipizirano je za alele lokusa HLA-A, -B, -DRB1. Utvrđeno je ukupno 30 različitih alela HLA-A, 54 alela HLA-B i 38 alela HLA-DRB1 kod navedenih ispitanika. Od toga, najčešći alel lokusa HLA-A bio je HLA-A*02:01 (30,31%), lokusa HLA-B alel HLA-B*51:01 (12,48%) dok je na lokusu HLA-DRB1 najčešći alel bio HLA-DRB1*03:01 (11,13%). Pet najčešće uočenih alela testiranih lokusa HLA i njihove učestalosti unutar obitelji prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz pet najčešćih alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1 u skupini 350 obitelji, tj. roditelja (N=700). Učestalost navedenog alela HLA (F).

HLA-A*		HLA-B*		HLA-DRB1*	
alel	F(%)	alel	F(%)	alel	F(%)
02:01	30,31	51:01	12,48	03:01	11,13
01:01	13,71	18:01	8,27	01:01	9,86
24:02	10,91	08:01	7,99	16:01	9,63
03:01	10,34	07:02	7,21	07:01	8,20
11:01	6,70	44:02:01G	6,42	15:01	7,77

Unutar navedene skupine, segregacijom i izravnim brojanjem utvrđeno je ukupno 716 različitih haplotipova HLA-A-B-DRB1, a pet najčešćih haplotipova HLA-A-B-DRB1 prikazano je u Tablici 5. Navedeni haplotipovi HLA-A-B-DRB1 predstavljaju prave haplotipove HLA, a ne pretpostavljene haplotipove koji se izračunaju kod istraživanja nesrodnih ispitanika. Najčešći haplotip bio je HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 s učestalošću od 5,35%, dok se ostali javljaju sa znatno nižim učestalostima.

Tablica 5. Prikaz pet najčešćih haplotipova HLA-A-B-DRB1 u skupini 350 obitelji, tj. roditelja (N=700). Učestalost navedenog haplotipa HLA-A-B-DRB1 (F), B*44:02:01G – B*44:02 ili B*44:27 ([#]).

Haplotip HLA-A*-B*-DRB1*	F (%)
01:01-08:01-03:01	5,35
02:01-18:01-11:04	1,57
02:01-27:02-16:01	1,50
02:01-27:05-01:01	1,43
02:01-44:02:01G [#] -16:01	1,28

4.2. Analiza haplotipova alela DRB1*03:01 unutar obitelji

Dio ispitanika iz skupine 350 obitelji, točnije njih 157, pozitivni su za alel HLA-DRB1*03:01 te čine prvu skupinu ispitanika kod kojih smo pratili učestalost haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01.

4.2.1. Analiza haplotipova HLA-B-DRB1*03:01

U Tablici 6 prikazani su haplotipovi HLA-B-DRB1*03:01 i njihove učestalosti u skupini od 157 ispitanika. Ukupno su uočena 22 različita haplotipa HLA-B-DRB1*03:01, tj. 22 različita alela na lokusu HLA-B. Prema dobivenim rezultatima najčešći haplotipovi HLA-B-DRB1*03:01 bili su: HLA-B*08:01-DRB1*03:01 (58,60%), HLA-B*14:02-DRB1*03:01 (5,73%) i HLA-B*51:01-DRB1*03:01 (4,46%).

Tablica 6. Raspodjela haplotipova HLA-B-DRB1*03:01 u prvoj ispitnoj skupini (N=157). Broj ispitanika pozitivnih za navedeni haplotip HLA-B-DRB1*03:01 (n), učestalost navedenog haplotipa HLA-B-DRB1*03:01 (F).

HLA-B*-DRB1*	n	F (%)		HLA-B*-DRB1*	n	F (%)
08:01-03:01	92	58,60		44:02-03:01	3	1,91
14:02-03:01	9	5,73		58:01-03:01	3	1,91
51:01-03:01	7	4,46		27:05-03:01	2	1,27
50:01-03:01	6	3,82		15:01-03:01	1	0,64
35:01-03:01	5	3,18		15:18-03:01	1	0,64
07:02-03:01	4	2,55		27:02-03:01	1	0,64
18:01-03:01	4	2,55		37:01-03:01	1	0,64
35:03-03:01	4	2,55		39:01-03:01	1	0,64
49:01-03:01	4	2,55		39:10-03:01	1	0,64
35:08-03:01	3	1,91		40:02-03:01	1	0,64
41:01-03:01	3	1,91		44:03-03:01	1	0,64

4.2.2. Analiza haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01

Unutar iste skupine od 157 ispitanika, ukupno je utvrđeno 56 različitih haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01. Od toga je 17 haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01 uočeno dva ili više puta, a njihove učestalosti prikazane su u Tablici 7. Najučestaliji haplotipovi bili su: HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 (47,77%) kojeg je imalo čak 75 ispitanika ove skupine, te HLA-A*33:01-B*14:02-DRB1*03:01 (5,10%) kojeg je imalo 8 ispitanika, što je u skladu s rezultatima iz Tablice 6. Ostali haplotipovi HLA-A-B-DRB1*03:01 javili su se s učestalošću manjom od 5%.

Tablica 7. Prikaz haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01 uočenih dva i više puta kod prve ispitne skupine (N=157). Broj ispitanika pozitivnih za navedeni haplotip HLA-A-B-DRB1*03:01 (n), učestalost navedenih haplotipova u ispitivanom uzorku (F), B*44:02:01G - B*44:02 ili B*44:27 ([#]).

Redni broj	HLA-A*-B*-DRB1*	n	F (%)
1	01:01-08:01-03:01	75	47,77
2	33:01-14:02-03:01	8	5,10
3	02:01-08:01-03:01	4	2,55
4	03:01-08:01-03:01	3	1,91
5	31:01-35:08-03:01	3	1,91
6	33:03-58:01-03:01	3	1,91
7	24:02-08:01-03:01	2	1,27
8	25:01-08:01-03:01	2	1,27
9	03:01-35:01-03:01	2	1,27
10	31:01-35:03-03:01	2	1,27
11	32:01-41:01-03:01	2	1,27
12	03:01-44:02:01G [#] -03:01	2	1,27
13	24:02-49:01-03:01	2	1,27
14	02:05-50:01-03:01	2	1,27
15	23:01-50:01-03:01	2	1,27
16	01:01-51:01-03:01	2	1,27
17	11:01-51:01-03:01	2	1,27

Od ukupnog broja haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01, njih 39 uočeno je samo jednom. Kombinacije alela HLA-A, -B koje tvore haplotipove s alelom HLA-DRB1*03:01, uočene samo jednom, prikazane su u Tablici 8.

Tablica 8. Prikaz haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01 uočenih samo jednom unutar prve ispitne skupine (N=157). B*44:02:01G - B*44:02 ili B*44:27 ([#]).

HLA-A*-B*-DRB1*	HLA-A*-B*-DRB1*	HLA-A*-B*-DRB1*
02:01-07:02-03:01	24:02-18:01-03:01	24:02-39:01-03:01
03:01-07:02-03:01	25:01-18:01-03:01	03:02-39:10-03:01
24:02-07:02-03:01	30:01-18:01-03:01	32:01-40:02-03:01
25:01-07:02-03:01	30:02-18:01-03:01	02:01-41:01-03:01
03:02-08:01-03:01	24:02-27:02-03:01	02:01-44:02:01G [#] -03:01
11:01-08:01-03:01	02:01-27:05-03:01	23:01-44:03-03:01
23:01-08:01-03:01	31:01-27:05-03:01	02:02-49:01-03:01
32:01-08:01-03:01	25:01-35:01-03:01	11:01-49:01-03:01
33:01-08:01-03:01	31:01-35:01-03:01	01:01-50:01-03:01
68:01-08:01-03:01	32:01-35:01-03:01	29:01-50:01-03:01
02:01-14:02-03:01	01:01-35:03-03:01	02:01-51:01-03:01
11:01-15:01-03:01	24:02-35:03-03:01	02:06-51:01-03:01
02:01-15:18-03:01	01:01-37:01-03:01	68:01-51:01-03:01

4.3. Analiza alela HLA-DRB3 unutar druge skupine ispitanika

Druga istraživana skupina obuhvatila je 73 nesrodna ispitanika pozitivna za alel HLA-DRB1*03:01 koji su tipizirani za alele lokusa DRB3 (Tablica 9). U ispitivanom uzorku uočena su dva različita alela DRB3 i to: alel HLA-DRB3:01:01:02 i alel HLA-DRB3*02:02:01:01. Daljnja analiza obuhvatila je istraživanje alela lokusa DRB3 s obzirom na prisustvo alela HLA-B*08:01 za kojeg se zna da je u jakom LD-u s alelom HLA-DRB1*03:01. Dobiveni su sljedeći rezultati: unutar skupine ispitanika pozitivnih za alel HLA-B*08:01, alel HLA-DRB3*01:01:02 bio je prisutan u 92,7% slučajeva, dok je među ispitanicima negativnim za alel HLA-B*08:01 bilo skoro dvostruko više ispitanika s alelom HLA-DRB3*02:02:01:01. Obje razlike su statistički vrlo značajne ($p < 0,0001$).

Tablica 9. Raspodjela alela HLA-DRB3 među ispitanicima pozitivnim za alel DRB1*03:01 na temelju prisustva/odsustva alela HLA-B*08:01 (N=73). Učestalost alela DRB3 unutar pojedine podskupine (F).

HLA-DRB3*	HLA-DRB1*03:01 poz. (N=73)		p
	HLA-B*08:01 poz. (n=41) F	HLA-B*08:01 neg. (n=32) F	
01:01:02	38 (92,68%)	11 (34,37%)	<0,0001
02:02:01:01	3 (7,32%)	21 (65,63%)	

4.3.1. Analiza alela HLA-A kod podskupine ispitanika pozitivnih za kombinaciju alela HLA-B*08:01-DRB1*03:01

Podskupinu ispitanika, kod kojih pretpostavljamo da aleli HLA-B*08:01 i HLA-DRB1*03:01 tvore zajednički haplotip (N=41), podijelili smo dodatno u dvije grupe na temelju prisustva/odsustva alela HLA-A*01:01 (Tablica 10) zbog toga što je alel HLA-A*01:01 dio tzv. autoimunog haplotipa. Dobiveni rezultati za obje grupe ispitanika, bilo pozitivnih, bilo negativnih za alel HLA-A*01:01, gotovo su isti: alel HLA-DRB3*01:01:02 bio je prisutan u 92,31% slučajeva u grupi ispitanika pozitivnih za alel HLA-A*01:01 i u 93,33% slučajeva unutar grupe ispitanika negativnih za alel HLA-A*01:01. Obje razlike nisu statistički značajne ($p>0,05$).

Tablica 10. Raspodjela alela HLA-DRB3 među ispitanicima pozitivnim za alele HLA-B*08:01 i -DRB1*03:01 na temelju prisustva/odsustva alela HLA-A*01:01 (N=41). Učestalost alela DRB3 unutar pojedine podskupine (F), rezultat nije statistički značajan (NS).

HLA-DRB3*	HLA-B*08:01-DRB1*03:01 poz. (N=41)		p
	HLA-A*01:01 poz. (n=26) F	HLA-A*01:01 neg. (n=15) F	
01:01:02	24 (92,31%)	14 (93,33%)	NS
02:02:01:01	2 (7,69%)	1 (6,67%)	NS

4.3.2. Analiza alela HLA-A, -B kod podskupine ispitanika negativnih za alel HLA-B*08:01

Unutar druge podskupine ispitanika, pozitivnih za alel HLA-DRB1*03:01 i negativnih za alel HLA-B*08:01 (N=32), također su prisutna dva alela HLA-DRB3. Kod približno jedne trećine ispitanika bio je prisutan alel HLA-DRB3*01:01:02. Unutar ove podskupine uočeno je

9 različitih alela HLA-A od kojih se s najvećom učestalošću javlja alel HLA-A*01:01 (22,73%). Kod preostalih ispitanika, njih 21, prisutan je alel HLA-DRB3*02:02:01:01. Ukupno je uočeno 13 različitih alela HLA-A, a najčešći je bio alel HLA-A*02:01 (28,57%). Raspodjela alela HLA-A za obje skupine prikazana je u Tablici 11. Razlike između učestalosti alela nisu statistički značajne.

Tablica 11. Raspodjela alela HLA-A, kod ispitanika negativnih za alel HLA-B*08:01, ovisno o alelu HLA-DRB3. Broj ispitanika pozitivnih za navedeni alel HLA (n), učestalost alela HLA u postocima (%), rezultat nije statistički značajan (NS).

HLA-A*	DRB3*01:01:02 (N=11) n (%)	DRB3*02:02:01:01 (N=21) n (%)	p
01:01	5 (22,73)	5 (11,90)	NS
02:01	3 (13,64)	12 (28,57)	NS
03:01	3 (13,64)	7 (16,67)	NS
11:01	1 (4,55)	3 (7,14)	NS
24:02	3 (13,64)	1 (2,38)	NS
25:01	-	1 (2,38)	NS
26:01	1 (4,55)	3 (7,14)	NS
30:01	-	1 (2,38)	NS
29:02	2 (9,09)	-	NS
31:01	1 (4,55)	1 (2,38)	NS
32:01	-	2 (4,76)	NS
33:01	-	4 (9,52)	NS
66:01	-	1 (2,38)	NS
68:01	3 (13,64)	1 (2,38)	NS

Raspodjela alela HLA-B za obje podskupine prikazana je u Tablici 12. U skupini ispitanika pozitivnih za alel HLA-DRB3*01:01:02 ukupno je otkriveno 10 različitih alela

HLA-B od kojih je najčešće prisutna bila grupa alela HLA-B*44:02:01G (22,73%) te alel HLA-B*07:02 (18,18%). U drugoj podskupini ispitanika, pozitivnih za alel HLA-DRB3*02:02:01:01, ukupno je uočeno 16 različitih alela HLA-B, a najčešće je bio prisutan alel HLA-B*50:01 (14,29%). Razlike u alelima HLA-B između dvije podskupine također nisu statistički značajne.

Tablica 12. Raspodjela alela HLA-B, kod ispitanika negativnih za alel HLA-B*08:01, ovisno o alelu HLA-DRB3. Broj ispitanika pozitivnih za navedeni alel HLA (n), učestalost alela HLA u postocima (%), B*44:02 ili B*44:27 ([#]), rezultat nije statistički značajan (NS).

HLA-B*	DRB3*01:01:02 (N=11) n (%)	DRB3*02:02:01:01 (N=21) n (%)	p
07:02	4 (18,18)	3 (7,14)	NS
13:02	-	1 (2,38)	NS
14:01	-	4 (9,52)	NS
14:02	-	1 (2,38)	NS
15:01	-	3 (7,14)	NS
18:01	1 (4,55)	-	NS
35:01	-	2 (4,76)	NS
35:02	1 (4,55)	-	NS
35:03	3 (13,64)	1 (2,38)	NS
37:01	1 (4,55)	-	NS
38:01	-	1 (2,38)	NS
39:01	2 (9,09)	2 (4,76)	NS
41:01	-	3 (7,14)	NS
44:02:01G [#]	5 (22,73)	4 (9,52)	NS
49:01	1 (4,55)	3 (7,14)	NS
50:01	1 (4,55)	6 (14,29)	NS
51:01	3 (13,64)	2 (4,76)	NS
57:01	-	4 (9,52)	NS
58:01	-	2 (4,76)	NS

5. RASPRAVA

Istraživanja polimorfizma HLA, kao i razlika u učestalosti alela i haplotipova HLA među populacijama, imaju veliku i važnu primjenu kod izbora davatelja u transplantaciji tkiva i organa, ali i u istraživanju povezanosti gena HLA s autoimunim bolestima te populacijskoj genetici. Unatoč velikom broju radova koji se bave raspodjelom alela i haplotipova HLA u različitim populacijama u svijetu, na brojna pitanja još nemamo odgovore. Stoga je i cilj ovog rada bio dati uvid u raznovrsnost alela lokusa HLA-DRB3 u haplotipovima DRB1*03:01 u Hrvatskoj, čime se upotpunjuje slika o polimorfizmu gena HLA u našoj populaciji. U istraživanje smo uključili dvije skupine ispitanika: prva skupina je obuhvatila 350 obitelji, tj. roditelja kod kojih smo pratili nasljeđivanje haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01, dok je druga skupina obuhvatila 73 nesrodna ispitanika pozitivna za alel HLA-DRB1*03:01.

Analizom raspodjele haplotipova HLA-A-B-DRB1 u obiteljima, uočeno je da je među nesrodnim ispitanicima najučestaliji haplotip HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01, što je u skladu s rezultatima istraživanja u Hrvatskoj [12]. Haplotip HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01, tzv. autoimuni haplotip, najčešći je haplotip u gotovo svim populacijama evropskog porijekla, za koje postoje dostupni podaci. Ovaj haplotip se navodi kao karakterističan evropski haplotip [11, 13, 20]. Što se tiče ostalih haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01 uočenih u obiteljskim segregacijskim analizama, ukupno je utvrđeno 56 različitih haplotipova, a osim spomenutog tzv. autoimunog haplotipa kao daleko najčešćeg, nekoliko puta su se javili haplotipovi HLA-A*02:01-B*08:01-DRB1*03:01 i HLA-A*03:01-B*08:01-DRB1*03:01 što odgovara rezultatima prethodno provedenih istraživanja u Hrvatskoj, ali i u drugim populacijama u Evropi [12, 20, 21].

Haplotip HLA-A*33:01-B*14:02-DRB1*03:01 pokazao je povećanu učestalost (bez statistički značajne razlike) u usporedbi s prethodnim podacima za našu populaciju (5,1%). Zastupljenost haplotipa HLA-A*33:01-B*14:02-DRB1*03:01 u Evropi iznosi između 0,03% do 0,77% [26]. Za ovaj haplotip poznato je da se veže s mutacijom gena CYP21A2 koji je smješten u centralnoj regiji HLA na kromosomu 6 i kodira enzim 21-hidroksilazu (21-OH). Genskom konverzijom funkcionalnog gena CYP21A2 i homolognog mu pseudogena CYP21A1P, dolazi do mutacije u eksonu 7 što vodi u razvoj autosomno recesivne bolesti – kongenitalne adrenalne hiperplazije [22].

Ovim istraživanjem je potvrđena snažna neravnoteža udruživanja između alela HLA-B*08:01 i alela HLA-DRB1*03:01, što je vidljivo iz rezultata prikazanih u Tablici 6. Naime, ova kombinacija HLA-B-DRB1 bila je prisutna na 58,6% haplotipova. Iz tog razloga, naredni

cilj ovog rada bio je analizirati raspodjelu haplotipova HLA-DRB1*03:01-DRB3 među nesrodnim ispitanicima te utvrditi postoje li razlike s obzirom na prisustvo/odsustvo alela HLA-B*08:01.

U populacijama evropskog porijekla, alel HLA-DRB1*03:01 pokazuje snažnu neravnotežu udruživanja s alelima gena HLA-DRB3 [23]. U ovom istraživanju uočena su dva alela lokusa HLA-DRB3, alel HLA-DRB3*01:01:02 koji je češće bio udružen s alelom HLA-DRB1*03:01 (67,1%) unutar istog haplotipa, i alel HLA-DRB3*02:02:01:01 (32,9%), što odgovara rezultatima drugih istraživanja provedenih u Evropi [23, 24]. Također, istraživanja drugih autora jasno su pokazala da se raspodjela haplotipova HLA-DRB1*03:01-DRB3 značajno razlikuje između različitih rasa, odnosno etničkih skupina (Tablica 13) [24].

Tablica 13. Učestalost haplotipova HLA-DRB1*03:01-DRB3 u različitim populacijama s obzirom na njihovo porijeklo. Populacije evropskog porijekla (CAU), populacije afričkog porijekla (AFA), populacije španjolskog porijekla (HIS). (Preuzeto s: [24]).

HLA-DRB1*-DRB3*	Etničke skupine		
	CAU	AFA	HIS
03:01-01:01	83,1%	36,1%	53,2%
03:01-02:02	16,2%	62,3%	46,8%

Naši rezultati pokazali su da kod ispitanika pozitivnih za haplotip HLA-B*08:01-DRB1*03:01, u 92,7% slučajeva prisutan je alel HLA-DRB3*01:01:02 što je u skladu s podacima o raspodjeli tog alela u drugim populacijama evropskog porijekla [23, 24].

Kod ispitanika negativnih za alel HLA-B*08:01, alel HLA-DRB3*02:02:01:01 javlja se s dvostruko većom učestalošću od drugog uočenog alela HLA-DRB3 unutar pretpostavljenog haplotipa HLA-B-DRB1*03:01-DRB3. Nije uočena značajna raspodjela alela HLA-A s obzirom na alel HLA-DRB3, već se svi aleli HLA-A javljaju s podjednakim učestalostima. Što se tiče lokusa HLA-B, uočeno je da kod svih ispitanika pozitivnih za alel HLA-DRB3*01:01:02 prisutan je jedan od sljedeća tri alela: HLA-B*35:03, B*44:02:01G,

B*51:01. Međutim, dodatnom provjerom i usporedbom navedenih alela među ispitanicima s različitim alelima HLA-DRB3, ustanovili smo da ne možemo govoriti o njihovoj međusobnoj povezanosti.

Prema dobivenim rezultatima, tzv. autoimuni haplotip HLA-A*01-B*08-DRB1*03:01 u Hrvatskoj se javlja u kombinaciji s alelom HLA-DRB3*01:01:02, i to s učestalošću većom od 90%, što odgovara prethodno spomenutim rezultatima o učestalosti haplotipa HLA-B*08:01-DRB1*03:01-DRB3*01:01:02. Također, prošireni oblik ovog haplotipa HLA-A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DRB3*01:01-DQB1*02:01, koji pokazuje jednu od najsnažnijih neravnoteža udruživanja u populacijama evropskog porijekla, čini prvi haplotip po zastupljenosti u tim istim populacijama (Tablica 14) [30].

Tablica 14. Usporedba zastupljenosti haplotipova među različitim etničkim skupinama. Populacije evropskog porijekla (CAU), populacije afričkog porijekla (AFA), populacije azijskog porijekla (API). (Preuzeto i prilagođeno prema: [30]).

Etnička skupina	Pozicija po učestalosti
Haplotip HLA-A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DRB3*01:01-DQB1*02:01	
CAU	1
AFA	2
API	177
Haplotip HLA-A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DRB3*02:02-DQB1*02:01	
CAU	341
AFA	570
API	174

Na temelju svega iznesenog, možemo zaključiti da su rezultati ovog istraživanja od velike važnosti za dobivanje uvida u polimorfizam haplotipova DRB1*03:01 u Hrvatskoj te su u skladu s podacima za druge populacije evropskog porijekla.

6. ZAKLJUČAK

1. Najčešći alel na lokusu HLA-B u haplotipu HLA-DRB1*03:01 bio je alel HLA-B*08:01 (58,6%) što je statistički značajno više ($p < 0,05$) u usporedbi sa svima drugim alelima lokusa HLA-B.
2. Najčešći haplotip HLA-A-B-DRB1*03:01 među istraživanim obiteljima bio je haplotip HLA-A*01:01-B*08:01-DRB1*03:01 koji je uočen kod 47,8% ispitanika.
3. Ukupno je otkriveno 56 različitih haplotipova HLA-A-B-DRB1*03:01, od kojih se njih 39 (69,6%) pojavilo samo jednom.
4. Na lokusu HLA-DRB3 među HLA-DRB1*03:01 pozitivnim ispitanicima pronađena su dva alela: HLA-DRB3*01:01:02 (67,1%) i HLA-DRB3*02:02:01:01 (32,9%).
5. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) otkrivena je u raspodjeli alela HLA-DRB3 između HLA-B*08:01 pozitivnih i negativnih ispitanika.
6. Ispitanici s kombinacijom alela: HLA-B*08:01-DRB1*03:01 u 92,7% slučajeva pozitivni su za alel HLA-DRB3*01:01:02 što ukazuje na snažnu neravnotežu udruživanja ovih alela HLA.
7. Haplotip HLA-DRB1*03:01-DRB3 povezan je s prisustvom/odsustvom alela HLA-B*08:01, ali ne i alela na lokusu HLA-A.
8. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživanja provedenih u različitim populacijama evropskog porijekla.

7. LITERATURA

1. Bodmer W. F. (1987): The HLA system: structure and function. *Journal of Clinical Pathology* **40**: 948-958.
2. Žunec R. (2008): Molekularna tipizacija HLA, primjena u transplantaciji i dijagnostici. U: Sertić J. (ur.) *Klinička kemija i molekularna dijagnostika*, Zagreb, Medicinska naklada, str. 292-300.
3. Goldsby R. A. (2003): Major histocompatibility complex. U: Goldsby R.A. (ur.) *Kuby Immunology*. New York, Freeman W. H. and Company, str. 161-184.
4. Brkljačić-Kerhin V., Grubić Z. (2006): Glavni sistem tkivne snošljivosti u ljudi. U: Grgičević D. (ur.) *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*, Zagreb, Medicinska naklada, str. 254-258.
5. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. (2010): *Imunologija*. Medicinska naklada, Zagreb.
6. Williams T. M. (2001): Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *Journal of Molecular Diagnostic* **3**: 98-103.
7. Choo S. Y. (2007): The HLA system: genetics, immunology, clinical testing and clinical implications. *Yonsei Medical Journal* **48**: 11-23.
8. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J. (2001): *Immunobiology: the immune system in health and disease*, New York, Garland Science.
9. Shankarkumar U. (2004): The human leukocyte antigen (HLA) system. *International Journal of Human Genetics* **4** (2): 91-103.
10. Nunes J. M., Buhler S., Roessli D., Sanchez-Mazas A. & the HLA-net 2013 collaboration (2014): The *HLA-net GENE[RATE]* pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. *Tissue Antigens* **83**: 307-323.
11. Mack S. J., Cano P., Hollenbach J. A., He J., Hurley C. K., Middleton D., Moraes M. E., Pereira S. E., Kempenich J. H., Reed E. F., Setterholm M., Smith A. G., Tilanus M. G., Torres M., Varney M. D., Voorter C. E., Fischer G. F., Fleischhauer K., Goodridge D., Klitz W., Little A. M., Maiers M., Marsh S. G., Müller C. R., Noreen

- H., Rozemuller E. H., Sanchez-Mazas A., Senitzer D., Trachtenberg E., Fernandez-Vina M. (2013): Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens* **81** (4): 194-203.
12. Grubic Z., Burek Kamenaric M., Mikulic M., Stingl-Jankovic K., Maskalan M., Zunec R. (2014): HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *International Journal of Immunogenetics*, **41** (3): 211-221.
 13. Maiers M., Gragert L., Klitz W. (2007): High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Human Immunology* **68**: 779-788.
 14. Mack S. J., Tu B., Lazaro A., Yang R., Lancaster A. K., Cao K., Ng J., Katovich Hurley C. (2009): HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies distinguish eastern european Americans from the general european american population. *Tissue Antigens* **73** (1): 17-32.
 15. Kim K., Bang S. Y., Yoo D. H., Cho S. K., Choi C. B., Sung Y. K., Kim T. H., Jun J. B., Kang Y. M., Suh C. H., Shim S. C., Lee S. S., Lee J., Chung W. T., Kim S. K., Choe J. Y., Nath S. K., Lee H. S., Bae S. C. (2016): Imputing variants in HLA-DR beta genes reveals that HLA-DRB1 is solely associated with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Plos One* **11** (2): e0150283.
 16. Song E. Y., Park H., Roh E. Y., Park M. H. (2004): HLA-DRB1 and -DRB3 allele frequencies and haplotypic associations in Koreans. *Human Immunology* **65**: 270-276.
 17. Holdsworth R., Hurley C. K., Marsh S. G. E., Lau M., Noreen H. J., Kempenich J. H., Setterholm M., Maiers M. (2009): The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* **73** (2): 95-170.
 18. Andersson G. (1998): Evolution of the human HLA-DR region. *Frontiers in Bioscience* **3**: 739-745.
 19. Gough S. C. L., Simmonds M. J. (2007): The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Current Genomics* **8** (7): 453-465.

20. Lima B. A., Alves H. (2013): HLA-A, -C, -B and -DRB1 allelic and haplotypic diversity in bone marrow volunteer donors from northern Portugal. *Organs, Tissues & Cells* **16**: 19-26.
21. Vina M. A. F., Hollenbach J. A., Lyke K. E., Sztein M. B., Maiers M., Klitz W., Cano P., Mack S., Single R., Brautbar C., Israel S., Raimondi E., Khoriaty E., Inati A., Andreani M., Testi M., Moraes M. E., Thomson G., Stastny P., Cao K. (2012): Tracking human migrations by the analysis of the distribution of HLA alleles, lineages and haplotypes in closed and open populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367** (1590): 820–829.
22. Grubic Z., Maskalan M., Stingl Jankovic K., Zvecic S., Dumic Kubat K., Krnic N., Zunec R., Ille J., Kusec V., Dumic M. (2016): Association of HLA alleles and haplotypes with CYP21A2 gene p. V282L mutation in the Croatian population. *HLA Immune Response Genetics* **88**: 239-244.
23. Knipper A. J., Hakenberg P., Enczmann J., Kuhröber A., Kiesel U., Kögler G., Wernet P. (2000): HLA-DRB1,3,4,5 and -DQB1 allele frequencies and HLA-DR/DQ linkage disequilibrium of 231 German caucasoid patients and their corresponding 821 potential unrelated stem cell transplants. *Human Immunology* **61**: 605-614.
24. Tang T. F., Wang J., Slack R., Lin Y. S., Li L., Heine U., Ng J., Hartzman R. J., Katovich Hurley C. (2002): DRB1*03 diversity and DRB3 associations in five major population groups in the United States. *Human Immunology* **63**: 221-228.
25. <http://sciscogenetics.com/technology/human-leukocyte-antigen-complex/> (3.9.2016.)
26. <http://hla.alleles.org/alleles/index.html> (9.9.2016.)
27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3123> (10.09.2016.)
28. http://www.eupedia.com/genetics/HLA-DR_distribution_maps.shtml#DR3 (22.09.2016.)
29. <http://www.pypop.org/popdata/index.html> (12.09.2016.)
30. <http://www.haplostats.org/haplostats?execution=e1s1> (24.09.2016.)

8. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije

Datum i mjesto rođenja: 19.03.1993., Koprivnica, Republika Hrvatska

Obrazovanje

2007. – 2011. Srednjoškolsko obrazovanje

Gimnazija Fran Galović, Koprivnica

2011. – 2014. Prvostupnik biologije

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

Naslov završnog rada: Fitoestrogeni i osteoporoza

Radna iskustva

2013. – 2016. Student edukator, Zoološki vrt grada Zagreba

Osobne vještine

- hrvatski (materinski), engleski (C1), talijanski (A1)
- timski rad, komunikativnost, kreativnost, odgovornost, samostalnost u radu
- IT vještine (Microsoft Office)

Dodatne informacije

- sudjelovanje u manifestaciji 'Noć biologije' (2011., 2012., 2014., 2015.) i drugim sličnim manifestacijama sa ciljem promocije prirodnih znanosti (Dan za znanost, Znanstveni piknik, Znanstveni kvart – Interliber,...)
- članica speleološke udruge "Željezničar" i Hrvatskog biospeleološkog društva sa završenim prvim stupnjem (speleolog pripravnik)
- članica studentske udruge BIUS i voditeljica sekcije za biospeleologiju
- članica organizacijskog odbora Drugog simpozija studenata bioloških usmjerenja
- volontirala u Antropološkom centru (Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti), te pisala članke za web stranicu udruge Bioteka